

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-299346

(43)Date of publication of application : 30.10.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C12Q 1/68
 G01N 33/50
 // C12M 1/00
 C12M 1/34

(21)Application number : 2000-159144

(71)Applicant : NABA HIROYUKI

(22)Date of filing : 19.04.2000

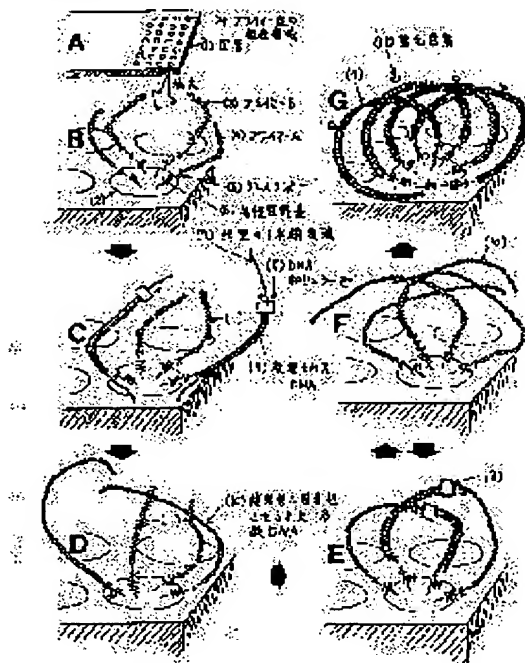
(72)Inventor : NABA HIROYUKI

(54) SOLID PHASE PCR METHOD USING IMMOBILIZED PRIMER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the principle of a solid phase PCR method by which a plurality of genes can simultaneously be amplified, to provide a method for performing the method, and to provide a technique for measuring the efficiency of the method.

SOLUTION: This solid phase PCR method comprising a process for synthesizing plural pairs of oligonucleotide primers at the different sites of a solid phase or binding the plural pairs of oligonucleotide primers to the different sites of the solid phase, a process for performing the PCR reactions from the respective pairs of the immobilized primers on the solid phase, and a process for quantifying DNA from the PCR reaction products produced at the plural sites of the solid phase.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's]

BEST AVAILABLE COPY

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-299346

(P2001-299346A)

(43) 公開日 平成13年10月30日 (2001. 10. 30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターム*(参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/50		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
// C 1 2 M 1/00		1/34	Z 4 B 0 6 3
1/34		C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 3 書面 (全 4 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-159144(P2000-159144)

(22) 出願日 平成12年4月19日 (2000. 4. 19)

(71) 出願人 500073906

那波 宏之

新潟県新潟市西大畑町5214 3-201

(72) 発明者 那波 宏之

新潟市西大畑町5214-3-201

Fターム (参考) 2G045 AA35 AA40 DA12 DA13 DA14
FB01 FB15

4B024 AA19 AA20 CA04 CA09 HA19

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR32

QR42 QR56 QR62 QR63 QS25

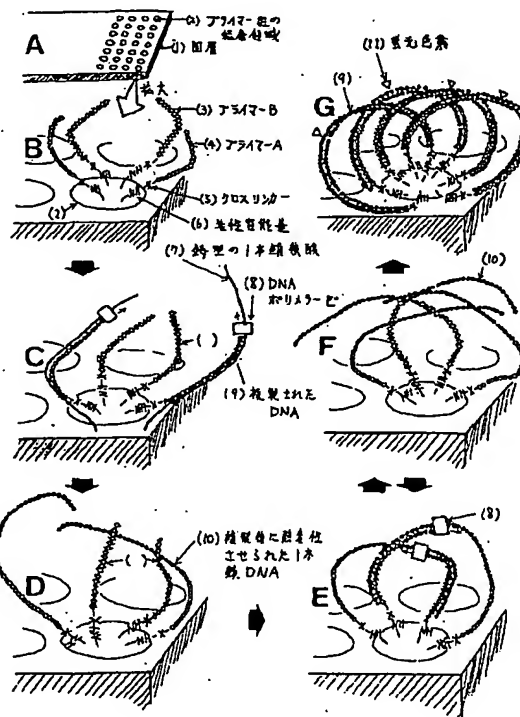
QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 固定化プライマーによる固相PCR法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、同時に複数個の遺伝子を増幅することができる固相PCR法の原理と、その実施方法と、その反応効率の測定の技術を提供することを目的とする。

【解決手段】 前記課題を解決するために、本発明は、複数組からなるオリゴヌクレオチドプライマー組のおのを、固相の異なった部分に合成させる、もしくは固相の異なった部分に結合させる工程と、核酸を鋳型として、固相上の各固定化プライマー組からPCR反応を同時に実施させる工程と、固相の複数の部位で産生されたPCR反応産物たるDNAを定量する工程と、を具備する方法よりなる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 固相上に結合したオリゴヌクレオチド2種以上よりなるプライマー組から、核酸を鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction；PCR）を固相上で実施させる方法。

【請求項2】 請求項1を実施するための、2種類以上のオリゴヌクレオチドを固相上の同一微小領域に合成させた固相部分、もしくは結合させた固相部分を、単数個もしくは複数個有する固相を作製する方法。

【請求項3】 請求項1の固相PCR法の反応効率を確認するために、固相上の単数個もしくは複数個の部位で産生されたPCR反応産物たるDNA量を効率良く定量する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応を利用する核酸複製技術に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 これまでのDNAポリメラーゼによるDNA合成の連鎖反応（Polymerase Chain Reaction；以下「PCR」と呼ぶ）は、液相において、複製増幅しようとする1つの遺伝子の核酸塩基配列に相補的な1組の合成オリゴヌクレオチドより開始されるため、1反応容器において1種類の遺伝子断片しか、複製増幅させることができなかった。そのため、複数の遺伝子や複数の遺伝子領域を複製増幅させたい場合、もしくはそのPCR反応の成否を判定したい場合、対応する数の反応液と反応容器を個別に準備する必要があった。

【0003】 また、このPCR反応の原理とその増幅効率の良さを利用して、PCR反応により細胞の遺伝子産物であるRNAの微量濃度を比較する、もしくは測定することも一般に行われている。この場合も1種類の遺伝子に由来するRNA濃度を測定するために、1つの反応液と反応容器を必要とした。そのため、多数の遺伝子産物のRNA濃度の測定には対応する数の反応液と反応容器を個別に準備し、また、反応産物も個々に定量する必要があり、手間がかかった。

【0004】 現在、細胞や組織資料に由来する多数の遺伝子産物たるRNAの測定には、選択的な核酸のハイブリダイゼーション法と多数の核酸固定化技術を組み合わせたDNAマイクロアレイや、DNAチップとよばれる測定方法が存在するが、これらは相同性の高い遺伝子配列も合算して定量してしまうことがあり、現状では、

【0003】に記した定量的PCR法に比べ、その特異性に問題を残している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、同時に複数個の遺伝子を増幅することができる固相PCR法の原理

と、その実施方法と、その反応効率の測定の技術を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 前記課題を解決するために、本発明は、複数組からなるオリゴヌクレオチドプライマー組のおのおのを、固相の異なった部分に合成させる、もしくは固相の異なった部分に結合させる工程と、核酸を鋳型として、固相上の各固定化プライマー組からPCR反応を同時に実施させる工程と、固相の複数の部位で産生されたPCR反応産物たるDNAを定量する工程と、を具備する方法よりなる。

【0007】

【発明の実施の形態】 PCR反応によりある核酸断片を増幅させる、もしくは特定の遺伝子の発現量（RNA）を定量するためには、まず、生物試料等から「核酸含有する試料」を採取する。核酸を抽出後、さらに、DNAもしくはRNAに純化精製する。本明細書において、「核酸」なる語には、任意の単純ヌクレオチド及び／又は修飾ヌクレオチドからなるポリヌクレオチド、例えばゲノムDNA、cDNA、mRNA、全RNA、hnRNA、等が含まれる。「修飾ヌクレオチド」には、イノシン、アセチルシチジン、メチルシチジン、メチルアデノシン、メチルグアノシンを含むリン酸エステルの他、紫外線や化学物質の作用で後天的に発生し得るヌクレオチドも含まれる。

【0008】 核酸中の特定の遺伝子断片、もしくは遺伝子領域をPCR法で分析、もしくは定量する場合、試料を採取した後、通常は、該試料から核酸を抽出する操作を行う。生体成分から核酸を抽出する方法としては、例えばフェノール抽出、エタノール沈殿の他、任意の抽出方法を使用し得る。mRNAを抽出する場合には、オリゴdTカラムにかけてもよい。

【0009】 通常、プライマーとなるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、PCR反応でDNA増幅させたい遺伝子領域の3' 端の各DNAストランドに対し相補的になるように50ヌクレオチドまでの長さで設定しておく必要がある。つまり、増幅させる遺伝子領域1つに対し、通常2種もしくはそれ以上（1組）のプライマーを必要とするので、本発明を実施するためには、この1組を固相の同じ領域に固定化されていることが必要である。1組のプライマーの固定化される領域の大きさは、小さいほど、より多くのプライマー組が固相上に結合させられるので好ましく、通常、4ミリメートル平方以下の大きさである。

【0010】 このPCR反応のためのプライマーの固定化（固相への結合）を行う方法は、大きく次の2通りに分けられる。そのひとつは、プライマーとなる各オリゴヌクレオチドを化学合成する時に、その5' 末端側にアミノ基、アルデヒド基、チオール基等の活性官能基を有する分子を共有結合させておく方法である（文献1、文

献2)。これを2種類以上のプライマー(1組)(3)(4)ごとに混合し、表面をシランカップリング剤等(6)で活性化させたガラスやシリカや耐熱性プラスチック等より成るの固相に、スペーサーやクロスリンカー(5)を介して共有結合させる。このプライマー組を固相上に1回スポットした後、また、異なるプライマー組を違う固相表面にスポットし、固定化する。このプライマー組の高密度のスポット作製は、DNAチップ作製装置(DNAアレイヤー)等を使ってできる。これを繰り返すことで、多種類のプライマーの組を固相上の異なる部位に固定することができる(2)。

【0011】もう一つの方法は、ガラスやシリコン基盤上に直接、プライマーとなる1組のオリゴヌクレオチドを化学合成させる方法である。通常、1種類のオリゴヌクレオチドを固相上に合成するには、Fodorら(文献3)の、光照射により選択的に除去されるフォトリソグラフィ技術と固相ヌクレオチド合成技術の組み合わせにより実現されるか、Southernら(文献4)のメニスカスシールによる微小反応槽を固相の一部に作ることで実現される。本発明における固相の同領域に2種以上(1組)のオリゴヌクレオチドを化学合成させる方法は、これらの技術を以下のように改変することで実現できると考えられる。つまりいずれの方法でも、ガラスやシリコン等からなる固相上に導入されたアミノ基等(6)の反応活性基の一部を、化学物質により可逆的に離脱しうる分子で保護、ブロックしておくことで、もしくは全部の官能基を保護したあと部分的に脱保護することで可能となる。つまり、現存する固相上の反応活性基から1種のオリゴヌクレオチドを化学合成させたあと、残存する保護された反応活性基の一部もしくは全部を離脱させ、活性化したあと、それを足場に異なる塩基配列に対して、オリゴヌクレオチドの合成手順を繰り返すことで、複数種のオリゴヌクレオチドを同じ固相部位に化学合成させることができる。

【0012】実際のPCRの反応は、複数のプライマー組を複数のスポットとして有する固相(1)を、DNAポリメラーゼ(8)と鋳型のなる核酸(7)、基質となるデオキシヌクレオチド3リン酸等をふくむ反応液(液相)と接触させ、あらかじめ最適化された各温度で、変性、アニーリング、複製の3段階を繰り返すことにより、図1にあるようにプライマーが固定化された部位に、複製されたDNA断片(9)が蓄積する。本発明での固相PCR法でも、通常のPCR法と同様、耐熱性細菌に由来するDNAポリメラーゼであるTaqDNAポリメラーゼ、TthDNAポリメラーゼ、PfuDNAポリメラーゼ等が使用しうる。このようにプライマーを固定化することで、各プライマーの塩基配列で特定化されて増幅産生されるDNA断片は、その固定化部位のみに結合しているので、その部位でのDNA量、もしくは標識ヌクレオチド3リン酸の取り込み量を測定すること

で、定量的PCR法として、目的とするPCR反応の成否、収率を判定することができる。

【0013】PCR産物である増幅DNA断片は、典型的には、PicoGreen™(Molecular Probes社)等の2本鎖DNAに特異的に結合するインターカレート蛍光色素を用いて、定量、検出することができる。生ずる蛍光の強度は、PCR産物であるDNA量に比例していて、これを固相のプライマー組が結合させてあった各部位ごとに、CCDカメラやフルオロイメーシングアナライザー(FLA;富士写真フィルム)等の操作によって、定量化することが可能である。定量的PCRとしてその他には、放射性物質、例えば32Pでラベルされたヌクレオチド3リン酸を用いて増幅産物を内部標識する方法を使用し得る。標識された増幅産物は、固相を洗浄することで遊離の放射性ヌクレオチド又はプライマーと分離することができる。次に、その固相を、オートラジオグラフィ、バイオイメーシングアナライザー(BAS;富士写真フィルム)等の操作によって、固相上にある複数の増幅産物量を放射活性として定量することができる。放射性物質の代わりに、蛍光物質や発光物質を標識基質としてPCR反応で使用し、フルオロイメーシングアナライザー、CCDカメラを用いて増幅産物を定量してもよい。また、望ましくは現在、多用されつつあるPCR反応同時定量装置(Real Time PCR装置)(GeneAmp5700;PE Biosystem社)等を用いて、固相のプライマー組が結合させてあった各部位ごとに、PCR反応のサイクル経過を追って反応産物量を経時的にモニターすることで、より信頼性の高い核酸の定量ができる。

【0014】(文献1) Lamture, J B et al.: Nucl. Acids Res. 22:2121-2125 (1994)

(文献2) Guo, Z et al.: Nucl. Acids Res. 22:5456-5465 (1994)

(文献3) Fodor, SPA et al.: Science 251:767-773 (1991)

(文献4) Maskos, U and Southern, EM: Nucl. Acid Res. 20:1679-1684 (1992)

【0015】

【発明の効果】本発明の原理と方法によれば、同じ核酸を鋳型として行う複数種のPCR反応を1つの反応容器で実施することが可能となり、これを応用することで、極く微量のゲノムDNAや細胞由来RNAを鋳型に、多数の遺伝子断片を一挙に増幅する、その増幅可能性の判定する、もしくは、多数の遺伝子量を正確に定量することを可能とせしめる。

【図面の簡単な説明】

【図1】固定化プライマーによるPCR法の一連の反応

の説明図

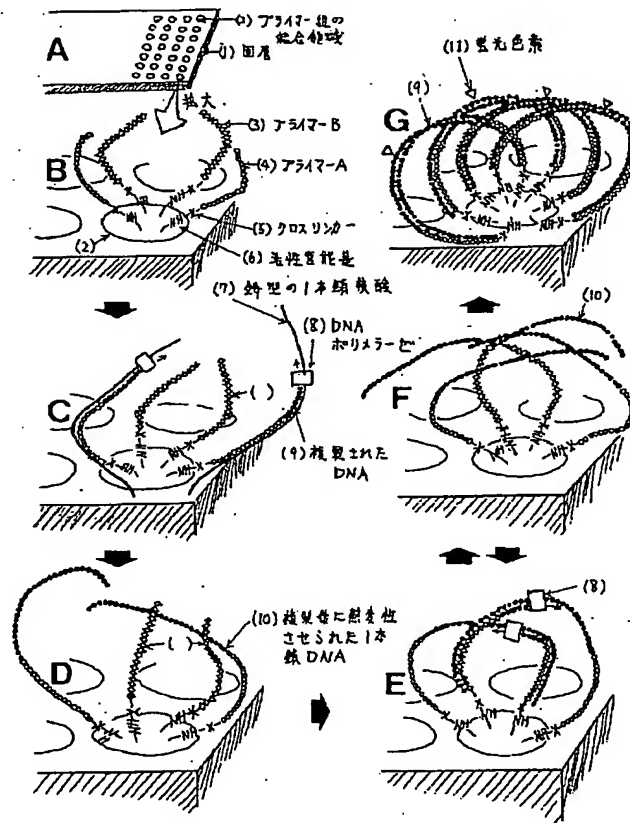
A；複数のプライマー組が共有結合で複数個スポットされたスライドガラス等の固相、B；1組（2種）のプライマーが固定化されたスポットの拡大図、C；酵素と基質を含む液相をAの固相と接触させ、鋳型の1本鎖核酸を片方のプライマーAとアニーリングさせた後、そのプライマーからDNA複製が開始した様子、D；DNA複製が修了後、熱変性により鋳型の核酸を除去された後、プライマーAから最初に合成されたDNAが1本鎖になっている様子、E；プライマーAから合成されたDNAが、プライマーBとアニーリングした後、再度、プライマーBからDNA複製が開始した様子、F；DNA複製

が修了後、熱変性により鋳型のDNAから解離し、全ての合成されたDNAが1本鎖になっている様子、G；EとFのステップの繰り返しにより、残存するプライマーから多量の2本鎖DNAが固相上スポットに合成され蓄積し、2本鎖DNA蛍光色素が結合した様子。

【符号の説明】

(1) 固相、(2) プライマー組の固相への結合領域、(3) プライマー-B、(4) プライマー-A、(5) クロスリンカー、(6) 活性官能基、(7) 鋳型の1本鎖核酸、(8) DNAポリメラーゼ、(9) 複製されたDNA、(10) 複製後に熱変性させられた1本鎖DNA、(11) 蛍光色素。

【図1】



BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY